

PENGARUH PEMBERIAN ELISITOR JAMUR *Phytium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. TERHADAP KANDUNGAN AJMALISIN PADA KULTUR KALUS BERAKAR *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

[The Effect of Elicitor Derived from *Phytium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. on Ajmalicine Content of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Root-Callus Culture]

Aprianita¹, Esyanti RR²✉ dan AH Siregar²

¹Jurusan Pendidikan MIPA Biologi, FKIP Universitas Jambi, Mendalo Darat, KM 15 Jambi

²Jurusan Biologi FMIPA ITB, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

ABSTRACT

An experiment to study the effect of elicitor derived from *Phytium aphanidermatum* on ajmalicine content of *Catharanthus roseus* root-callus culture has been conducted. Root-callus was induced from leaf segment, and grew optimally on Zenk medium with the addition of 10^{-7} M BAP and 10^{-5} M NAA. Root-callus was subcultured three times, and followed with elicitation with elicitor derived from autoclaved *P. aphanidermatum*. The concentration tested were 0.05, 0.5, 1.0 and 5.0 mg DW/ml, and harvested at 0, 18, 36 and 72 hours. The ajmalicine was analyzed qualitatively and quantitatively by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The result showed that ajmalicine content was influenced significantly by concentration of elicitor and harvesting time. A significant increase of ajmalicine content (153.29 ± 1.61 mg/g DW) was achieved by addition of 1 mg Dw/ml elicitor after 36 hours incubation.

Kata kunci/ Key words: *Catharanthus roseus*, Ajmalicine, Elicitor, Root-Callus Culture, *Phytium aphanidermatum*.

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman obat yang telah lama dimanfaatkan dalam skala industri adalah *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Verpoorte & Heijden, 1991). Tanaman ini mengandung lebih dari 100 senyawa kimia alkaloid, diantaranya ajmalisin yang dapat digunakan untuk mengatasi penyakit sirkulasi darah dan hipertensi (Kulkarni & Rafinda, 1987).

Persediaan yang cukup untuk produksi metabolit sekunder alami ternyata sulit dijamin, karena di alam tanaman tergantung pada iklim, penyakit, kendala-kendala dalam teknik penanaman serta membutuhkan waktu yang lama untuk tumbuh. Selain itu senyawa-senyawa tersebut sering hanya diproduksi pada tahap perkembangan tertentu (Payne *et al.*, 1987).

Kultur jaringan merupakan salah satu metode untuk mengatasi masalah-masalah di atas (Kurtz & Constabel, 1989). Keuntungan pemakaian teknik kultur jaringan dalam produksi metabolit sekunder antara lain adalah (1) dapat menghasilkan senyawa kimia dalam kondisi terkontrol dan waktu yang singkat, (2) dapat mensintesis senyawa baru yang tidak dihasilkan induknya (Mantell & Smith, 1985), (3) tidak tergantung pada lingkungan, serta (4) sistem produksinya dapat diatur (Wiendi *et al.*, 1992).

Namun pada beberapa kultur, produksi metabolit sekunder ini masih rendah. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder adalah dengan pemberian elisitor (Buitelaar *et al.*, 1991). Elisitor adalah materi biotik maupun abiotik yang dapat menginduksi atau meningkatkan biosintesis fitoaleksin dan metabolit sekunder lainnya (Endress, 1994).

Menurut Eilert *et al.* (1986), elisitor terbaik untuk menginduksi produksi ajmalisin pada kultur *C. roseus* adalah *Phytium aphanidermatum*. Elisitasi akibat homogenat itu diperoleh dari homogenat jamur dapat meningkatkan kandungan ajmalisin sebesar 66,39 % pada kultur kalus dalam medium Zenk dengan penambahan 2.5×10^{-6} M NAA dan 10^{-5} M BAP (Fitriani, 1998).

Pembentukan indol alkaloid seringkali berhubungan dengan diferensiasi morfologi sel. Kemampuan mensintesis vinblastin, vindolin, dan katarantin pada *C. roseus* berhubungan erat dengan diferensiasi menjadi pucuk dan daun sebagai tempat biosintesisnya (Miura *et al.*, 1988). Menurut Arens *et al.* (1974), ajmalisin merupakan alkaloid utama yang ditemukan pada akar tanaman, oleh karena itu kalus diarahkan untuk berdiferensiasi membentuk akar,

sehingga kandungan ajmalisin diharapkan dapat meningkat.

Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian elisitor yang diperoleh dari *P. aphanidermatum* terhadap kandungan ajmalisin pada kultur kalus berakar *C. roseus* dan selain itu bertujuan untuk menentukan konsentrasi elisitor serta waktu pemanenan yang optimum, yang dapat meningkatkan kandungan ajmalisin pada kultur kalus berakar *C. roseus*.

BAHAN DAN METODE

Bahan elisitor. Jamur *P. aphanidermatum* dipelihara dalam medium oatmeal agar (Van der Plaats-Niterink, 1981). Jamur dipelihara dan diperbanyak dengan cara menginokulasikan jamur pada medium yang sama seminggu sekali. Penentuan kurva tumbuh jamur dilakukan dengan menginokulasi jamur pada medium oatmeal cair dan diagitasi pada kecepatan 150 rpm. Miselium dipanen setiap hari sampai terjadi penurunan berat miselium. Miselium pada akhir fase pertumbuhan maksimum digunakan sebagai bahan elisitor (Eilert *et al.*, 1986).

Persiapan bahan elisitor. Miselium jamur disaring lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer berisi 100 ml aquades steril. Selanjutnya diotoklaf (121°C, 15 ps, 20 menit), setelah itu miselium disaring lagi dengan kertas saring *Whatman* no.1 steril, dan dikeringkan dalam oven 50°C hingga berat keringnya konstan. Miselium kering digerus sampai berbentuk bubuk. Untuk memperoleh homogenat jamur dengan konsentrasi yang diinginkan kemudian ditambahkan akuades steril (Eilert *et al.*, 1986). Dalam penelitian ini konsentrasi homogenat jamur yang digunakan adalah 0,05; 0,5; 1,0 dan 5,0 mg BK/ml. Seluruh pekerjaan dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow*.

Media. Medium yang digunakan untuk induksi kalus berakar adalah medium Zenk dengan penambahan zat pengatur tumbuh 10^{-7} M BAP dan 10^{-5} M NAA. Setelah kalus berakar tumbuh dengan baik maka dilakukan subkultur sebanyak tiga kali setiap tiga minggu.

Penentuan kurva tumbuh kalus berakar. Kurva tumbuh kalus berakar ditentukan dari berat kering kalus berakar, yaitu dengan menimbang kalus

yang telah dikeringkan dalam oven 50°C. Penimbangan dilakukan setiap dua hari sekali sampai diketahui seluruh fase pertumbuhan kalus berakar.

Penentuan kurva kandungan ajmalisin. Pengukuran kandungan ajmalisin dilakukan pada kalus berakar yang telah dikeringkan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan ajmalisin pada setiap fase pertumbuhan kalus berakar. Dari kurva tumbuh dan kurva kandungan ajmalisin dapat ditentukan waktu yang tepat untuk elisitasi.

Elisitasi. Elisitasi dilakukan secara aseptik dengan cara menambahkan 0,4 ml homogenat jamur dari masing-masing konsentrasi ke dalam kalus berakar, sedangkan kalus kontrol ditambah akuades steril dengan volume yang sama. Masing-masing perlakuan dan kontrol dilakukan tiga kali pengulangan. Kalus berakar dan kontrol yang telah diberi perlakuan kemudian diinkubasi selama 0, 18, 36 dan 72 jam. Setelah pemanenan, kalus kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C sampai berat kering konstan dan selanjutnya siap dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif dengan KCKT.

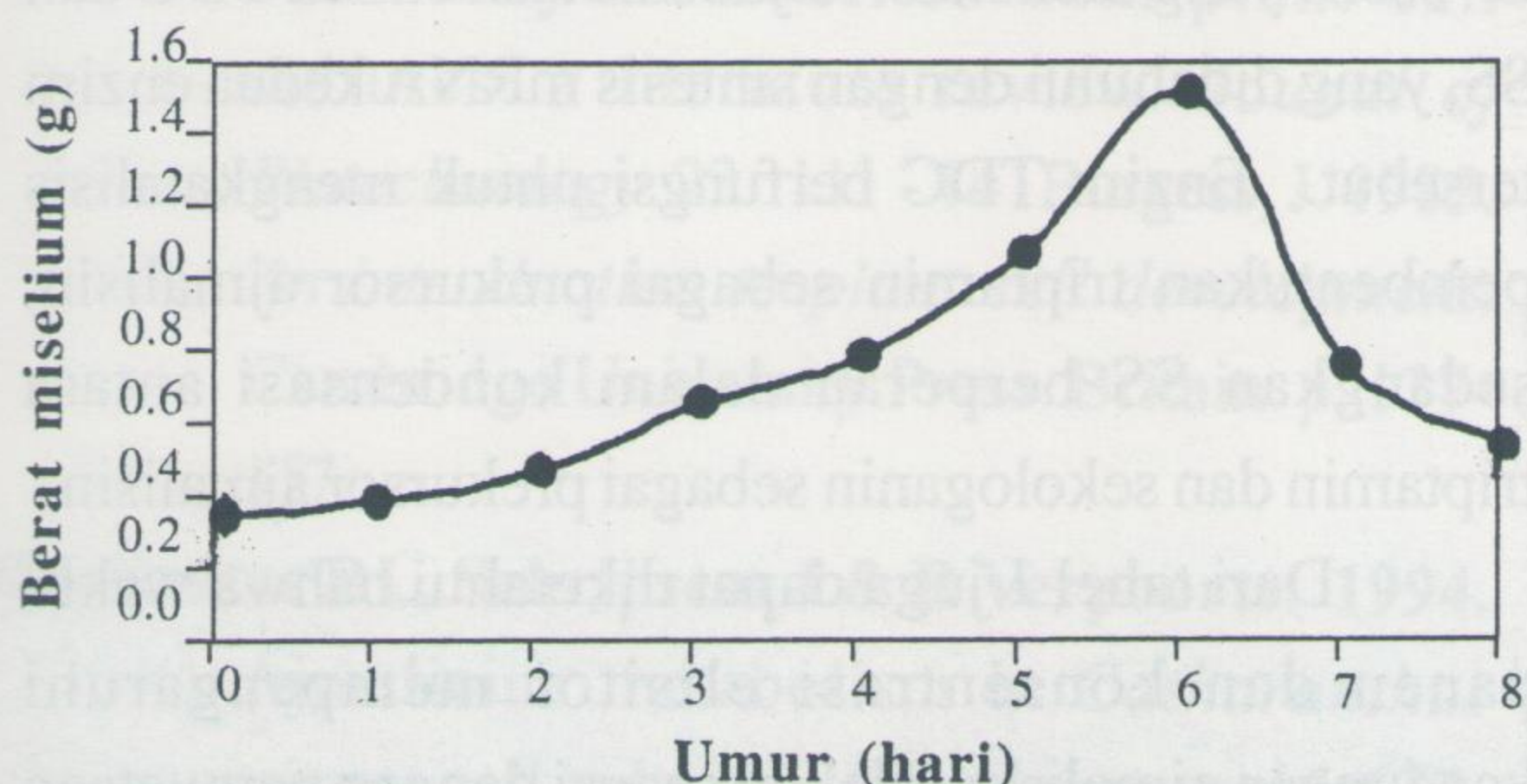
Ekstraksi bahan. Bahan kering, berupa kalus berakar diekstraksi dengan metode modifikasi dari Lee *et al.*, (1981, dalam Asada dan Shuler, 1987).

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif dengan KCKT. Analisis kualitatif dan kuantitatif untuk ajmalisin dilakukan dengan menggunakan KCKT dengan fase gerak berupa larutan metanol : asetonitril : diamonium hidrogen fosfat (3:4:3) pada pH 7. Kecepatan alir adalah 1 ml/menit dideteksi pada $\lambda = 298$ nm (Sim *et al.*, 1994). Jenis kolom adalah Shim-pack CLC-ODS (15 cm x 6 mm), sedangkan analisis dilakukan dengan kromatopak Shimadzu CR-7 A Plus.

Uji Statistik. Uji statistik untuk mengetahui pengaruh penambahan elisitor terhadap akumulasi ajmalisin dilakukan dengan analisis varian (ANOVA) dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika terlihat ada perbedaan nyata, analisis dilanjutkan dengan Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program "Statistica for Windows Release 4.3 Statsoft. Inc. 1993".

HASIL

Kurva tumbuh jamur. Jamur *Pythium aphanidermatum* yang ditumbuhkan pada medium oatmeal padat, dalam cawan petri, mulai tumbuh pada hari ke-2, dan terus tumbuh dengan cepat hingga pada hari ke-6 terlihat menutupi seluruh permukaan medium. Pada medium cair, fase pertumbuhan jamur juga berlangsung hingga hari ke-6 (Gambar 1).



Gambar 1. Kurva tumbuh jamur *Pythium aphanidermatum*.

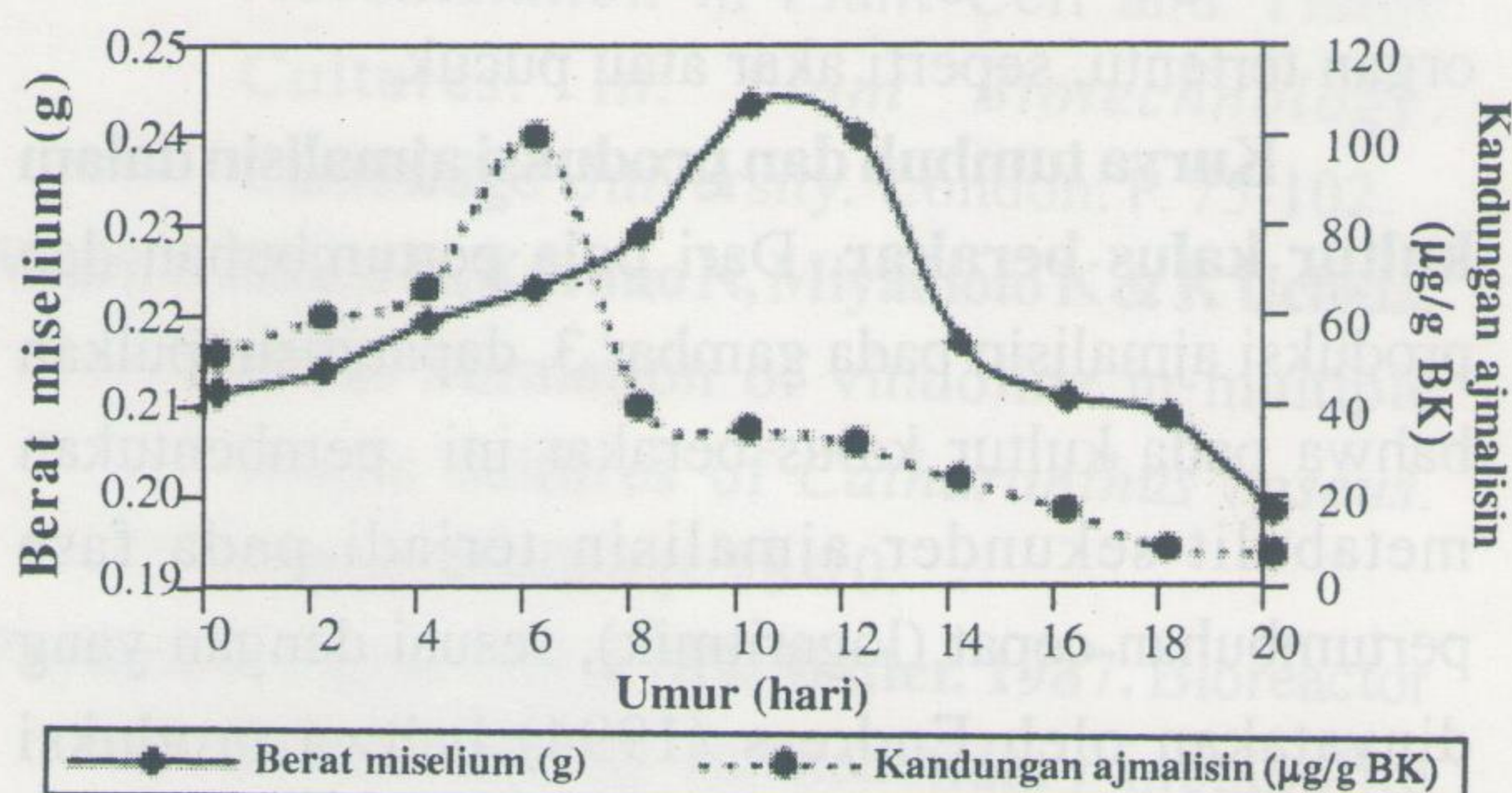
Medium optimum untuk kultur kalus berakar *C. roseus*. Kombinasi zat pengatur tumbuh yang optimum untuk pertumbuhan kalus berakar adalah 10^{-7} M BAP dan 10^{-5} M NAA. Dalam penelitian ini, pertumbuhan kalus berakar terbaik selain ditandai dengan berat yang tertinggi, juga ditandai oleh jumlah akar yang terbanyak (Gambar 2).



Gambar 2. Kultur kalus berakar *C. roseus*.

Kurva tumbuh dan produksi ajmalisin dalam kultur kalus berakar. Pada gambar 3 terlihat bahwa ajmalisin telah terdeteksi sejak hari ke-0, yaitu saat kultur mengalami pertumbuhan lambat (fase lag), dan terus meningkat hingga mencapai maksimum pada hari ke-6 saat pertumbuhan cepat (fase log) sedang berlangsung. Setelah hari ke-6 kandungan ajmalisin mulai menurun,

sedangkan pertumbuhan kultur terus berlangsung hingga mencapai fase stasioner, pada hari ke-10.



Gambar 3. Kurva tumbuh dan kandungan ajmalisin dalam kultur.

Pengaruh pemberian elisitor terhadap kandungan ajmalisin. Pada Tabel 1 terlihat bahwa persentase tertinggi peningkatan ajmalisin terhadap kontrol, yaitu sebesar 148,9%, terjadi setelah pemberian 1 mg BK/ml elisitor selama 36 jam. Hasil pada tabel juga memperlihatkan perbedaan peningkatan kandungan ajmalisin, dibanding kontrol, dalam setiap perlakuan elisitor pada waktu inkubasi yang berbeda.

PEMBAHASAN

Kurva tumbuh jamur. Jamur yang baik digunakan sebagai bahan elisitor adalah jamur yang telah melewati fase pertumbuhan maksimum, yaitu pada hari ke-6. Hal ini diduga karena setelah terjadi pertumbuhan maksimum, maka komponen dinding sel jamur yang berguna sebagai bahan elisitor sudah terbentuk sempurna. Vasquez-Flota *et al.* (1994) menyatakan bahwa jika menggunakan jamur yang sudah diotoklaf sebagai elisitor, maka komponen dinding sel dari jamur yang dapat berfungsi sebagai elisitor.

Medium optimum untuk kultur kalus berakar *C. roseus*. Menurut Kallack *et al.* (1996), tipe kalus akan menentukan kemampuan organogenesisnya, kalus yang kompak memiliki kemampuan untuk membentuk akar atau pucuk, tergantung zat pengatur tumbuh yang diberikan. Pada *Atropa belladonna*, diferensiasi kalus menjadi akar terjadi dengan cepat sehingga terbentuk perakaran adventif yang rapat.

Pada kultur kalus berakar ini, diharapkan pembentukan akar berkaitan erat dengan produksi dan penyimpanan ajmalisin. Hal ini seperti yang

dinyatakan Verpoorte & Van der Heijden (1991), bahwa pada kultur *C.roseus* pembentukan alkaloid seringkali berhubungan dengan diferensiasinya membentuk organ tertentu, seperti akar atau pucuk.

Kurva tumbuh dan produksi ajmalisin dalam kultur kalus berakar. Dari pola pertumbuhan dan produksi ajmalisin pada gambar 3, dapat disimpulkan bahwa pada kultur kalus berakar ini pembentukan metabolit sekunder ajmalisin terjadi pada fase pertumbuhan cepat (logaritmik), sesuai dengan yang dinyatakan oleh Endress (1994) bahwa produksi ajmalisin pada kultur sel terjadi pada fase log.

Pada penelitian ini, kultur kalus berakar menghasilkan ajmalisin yang lebih rendah dibandingkan dengan kalus yang tidak berakar. Kondisi ini dilaporkan pula pada kultur *Dioscorea deltoidea* dan *Agave wightii*, bahwa kultur yang berdiferensiasi membentuk akar dan umbi menghasilkan sapogenin lebih sedikit (Mantell & Smith, 1983). Hal ini diduga bahwa terjadi represi dari ekspresi gen-gen pengkode enzim-enzim yang terlibat dalam sintesis ajmalisin oleh adanya auksin dengan konsentrasi tinggi pada medium. Verpoorte & Van der Heijden (1991) menyatakan bahwa auksin bersifat menekan transkripsi gen yang berperan dalam sintesis enzim triptofan dekarboksilase (TDC) dan striktosidin sintase (SS), yang merupakan enzim kunci dalam sintesis ajmalisin.

Pengaruh pemberian elisitor terhadap kandungan ajmalisin. Elisitor dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder dengan dua cara, yaitu peningkatan aktivitas enzim dan peningkatan sintesis enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis metabolit tertentu. Pada penelitian ini, peningkatan ajmalisin diduga terjadi melalui peningkatan sintesis enzim, seperti yang dinyatakan Endress (1994) bahwa pada kultur sel *C.roseus* yang dielisitasi terjadi induksi enzim TDC dan SS, yang didahului dengan sintesis mRNA kedua enzim tersebut. Enzim TDC berfungsi untuk mengkatalisis pembentukan triptamin sebagai prekursor ajmalisin, sedangkan SS berperan dalam kondensasi antara triptamin dan sekologanin sebagai prekursor ajmalisin.

Dari tabel 1 juga dapat diketahui bahwa waktu panen dan konsentrasi elisitor mempengaruhi kandungan ajmalisin. Hal ini sesuai dengan pernyataan Eilert *et al.* (1985) bahwa faktor yang menentukan keberhasilan elisitasi diantaranya adalah konsentrasi elisitor dan waktu kontak antara sel dengan elisitor.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan pada Prof. DR. Robert Verpoorte, Division of Pharmacognosy, Center for Biopharmaceutical Sciences, Leiden University, The Netherlands yang telah memberikan ajmalisin murni sebagai senyawa pembanding dalam penelitian.

Tabel 1. Pengaruh elisitasi terhadap kandungan ajmalisin pada kultur kalus berakar *Catharanthus roseus*.

Konsentrasi elisitor (mg BK/ml)	Rata-rata kandungan ajmalisin (µg/g BK) pada pemanenan jam ke-			
	0	18	36	72
0,00 Kontrol	50,88 ± 1,500 a	57,06 ± 0,44 bc	61,59 ± 1,87 d	59,91 ± 2,90 cd
0,05	50,03 ± 2,72 a	68,34 ± 0,48 e	86,63 ± 1,31 gh	69,26 ± 1,74 ef
0,50	50,28 ± 0,50 a	89,90 ± 3,89 h	114,92 ± 1,89 j	83,74 ± 2,68 g
1,00	51,10 ± 2,72 a	117,82 ± 2,18 j	148,9 ± 1,61 k	102,99 ± 2,84 i
5,00	49,68 ± 0,92 a	71,96 ± 2,03 ef	72,94 ± 1,06 f	53,20 ± 1,33 ab

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata Berdasarkan uji Duncan pada taraf kepercayaan 95 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Asada M & ML Shuler. 1989. Stimulation of Ajmalicine Production and Excretion from *Catharanthus roseus* : Effect of Adsorption in Situ, Elicitor and Alginate Immobilization. *App.Microbiol.& Biotech.* 30 : 475-481.
- Buitelaar RM, Cesario MT and Tramper J. 1991. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *Journal of Biotechnology.* 23 : 111 - 141
- Burgess, J. 1985. *An introduction to plant cell development.* Cambridge University Press. Britain. p. 137-157.
- Dos Santos RL, Schripsem J & R Verpoorte. 1994. Ajmalicine metabolism in *Catharanthus roseus* cell culture. *Phytochemistry* 15:677-681.
- Eilert U, Constabel F and Kurz WGW. 1986. Elicitor stimulation of monoterpene indole alkaloid formation in suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* 126: 11-22.
- Endress R. 1994. *Plant cell biotechnology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. p.173 - 255.
- Fitriani A. 1998. *Pengaruh pemberian homogenat jamur Phythium aphanidermatum (Edson) Fitzp terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus Catharanthus roseus (L.) G. Don.* Tesis Magister. Program Pascasarjana. ITB. Bandung.
- Kulkarni RN & NS Ravinda. 1988. Resistance to *Pythium aphanidermatum* in diploids and induced autotetraploid of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica.* P.536-359.
- Kurz WGW & F Constabel. 1991. Produksi dan isolasi metabolit sekunder. Dalam: *Metode Kultur Jaringan Tanaman.* Wetter, L.R. & F. Constabel (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge.p.75-102.
- Mantell SH & H Smith. 1983. Cultural Factor that Influence Secondary Metabolites Accumulation in Plant Cell and Tissue Cultures. In: *Plant Biotechnology.* Cambridge University. London. P. 75-102.
- Miura Y, Hirata K, Kurano N, Miyamoto K & K Uchida. 1988. Formation of vindoline in multiple shoots cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica.*p. 18-20.
- Payne GF, Payne NN & ML Shuler. 1987. Bioreactor considerations for secondary metabolite production from plant cell tissue culture: Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengineering.* 31: 905-912.
- Sim JS, Chang NH, Liu RJ and Jung HK. 1994. Production and secretion of indol alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Effects of in-situ adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *Jurnal of Fermentation and Bioengineering* 78, 229-234.
- Wiendi NMA, Wattimena GA & LW Gunawan. 1992. Produksi senyawa metabolit sekunder dengan kultur jaringan. Dalam: *Bioteknologi Tanaman Wattimena, G.A (Eds).* Pusat Antar Universitas. IPB. Bogor.
- Van der Plaats - Niterink AJ. 1981. *Monograph of the genus Phytium.* Studies in Micology. Netherland. 21: 78-82.
- Vazquez-Flota, F Moreno-Zalanuela, O Miranda-Ham, ML Coellocoello J & VM Loyola-Vargas. 1994. Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue & organ cultures.* 38: 273-274.
- Verpoorte R & VDR Heijden. 1991. Plant Biotechnology for the Production of Alkaloids: Present Status and Prospect. In: *The Alkaloids.* Academic Press. Inc. 40: 87-142.